

## Identificação e mapeamento genético de QTL para a resistência ao míldio em milho

Sílvia N. J. Belicuas<sup>1</sup>, Isabel R. P. Souza<sup>2</sup>, Rodrigo V. Costa<sup>3</sup>, Luciano V. Cota<sup>4</sup>, Sidney N. Parentoni<sup>5</sup> e Ubiraci G. P. Lana<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas-MG, silvia@cnpmms.embrapa.br; <sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, isabel@cnpmms.embrapa.br; <sup>3</sup>Embrapa Milho e Sorgo, veras@cnpmms.embrapa.br; <sup>4</sup>Embrapa Milho e Sorgo, lvcota@cnpmms.embrapa.br; <sup>5</sup>Embrapa Milho e Sorgo, sidney@cnpmms.embrapa.br; <sup>6</sup>Embrapa Milho e Sorgo, ubiraci@cnpmms.embrapa.br.

Palavras-chave: milho, míldio, resistência a doenças, mapeamento de QTL.

### Revisão bibliográfica

O Brasil é um país de economia predominantemente agrícola, tendo esse setor um forte impacto na sustentabilidade socioeconômica nacional. Dentre as diversas atividades agrícolas existentes no país, a produção de grãos destaca-se como uma das mais importantes, merecendo atenção a cultura do milho. O milho é o cereal de maior importância econômica no mundo, sendo cultivado para a alimentação humana e animal, e para a produção de biocombustível. Nos últimos anos a produção de milho no Brasil vem experimentando aumentos expressivos decorrentes da evolução do sistema de cultivo, da disponibilidade de genótipos mais produtivos e adaptados a diversas regiões, da mecanização e do aumento da área de plantio à safrinha. Entretanto, a produtividade média brasileira, de 4.010 kg/ha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010), ainda é considerada baixa se comparada a de outros países produtores, como China, (5.000 kg/ha), Argentina (7.000 kg/ha) e Estados Unidos (9.000 kg/ha).

Dentre os fatores que contribuem para a limitada produtividade dessa cultura no Brasil destaca-se a suscetibilidade a doenças, especialmente preocupante atualmente em virtude da expansão da fronteira agrícola, da ampliação da época de plantio (safrinha), da adoção do plantio direto sem rotação de culturas e do emprego de cultivares suscetíveis (COSTA; COTA, 2009).

As doenças do milho podem afetar não apenas a produção, mas também a qualidade, a palatabilidade e o valor nutritivo dos grãos e da forragem. Dentre as doenças que ocorrem na cultura do milho, merecem destaque pela sua importância as doenças foliares, cujos danos são decorrentes do mau funcionamento e da destruição dos tecidos fotossintéticos, o que limita a interceptação da radiação solar e translocação de fotossintatos ao desenvolvimento de grãos. (CASA et al., 2005).

Em milho o míldio é causado pelo oomiceto *Peronosclerospora sorghi* (Weston e Uppal) CG Shaw. Inicialmente observado no Brasil no início da década de 1970, tem sido problema na cultura de milho principalmente nos três estados da região Sul do Brasil. É uma doença de grande potencial destrutivo, pois causa esterilidade quando as plantas são infectadas nos primeiros estádios de desenvolvimento, acarretando perda total na produção.

Plantas sistematicamente atacadas apresentam-se cloróticas e ocasionalmente exibem folhas com estrias e faixas brancas mais estreitas e eretas em relação às plantas saudáveis. Nas folhas inferiores encontram-se folhas com uma divisão transversal nítida entre o tecido doente



e sadio, dando à folha um aspecto de meia folha doente. Os colmos apresentam-se mais finos, acamados e possuem uma quantidade menor de raízes adventícias. Os pendões das plantas atacadas podem apresentar uma proliferação de estruturas filoides, em que as estruturas florais tomam o aspecto de pequenas folhas, ou apresentam folhas estreitas e eretas, sem a presença de pendão. Em ambos os casos, não há formação de espigas. No período noturno e em temperaturas entre 21°C e 23°C e presença de orvalho ocorre abundante produção de esporângios pelo fungo, os quais são disseminados pelo vento nas primeiras horas da manhã. Ainda, sob as mesmas condições ambientais, os esporângios germinam e infectam rapidamente as plantas de milho, causando lesões localizadas onde ocorre nova produção de esporângios. Após a infecção, se a temperatura ambiente se mantiver abaixo de 22°C, a severidade dessa doença pode atingir níveis epidêmicos. Ao final do ciclo, são formados os oósporos, que podem sobreviver nos restos de cultura e no solo por diversos anos. Dessa forma, o plantio de milho em uma área onde ocorreu severa epidemia de míldio corre o risco de ter reincidência severa dessa doença. O plantio direto é uma prática que aumenta o risco da doença por manter os resíduos com as estruturas do patógeno.

Dentre as estratégias de manejo de doenças, o uso de resistência genética e rotação de cultura são consideradas as mais eficientes. Entretanto, a prática de rotação de culturas é, tradicionalmente, pouco adotada por parte dos produtores devido, principalmente, a questões econômicas e de infraestrutura operacional. Desse modo, a utilização de genótipos resistentes destaca-se como a forma mais viável, segura e de menor impacto ambiental para o manejo das doenças (FERREIRA; CASELA, 2001; REZENDE et al., 2004).

A herança da resistência ao míldio em milho é descrita como uma característica quantitativa controlada por poucos genes. Três QTL (*Quantitative Trait Loci*) que contribuem para a resistência a *P. sorghi* foram detectados em uma população de linhagens recombinantes (*Recombinant Inbred Lines*, RIL) derivadas de um cruzamento entre as linhas puras G62 (resistente) e suscetível (G58) (AGRAMA et al., 1999). Dois destes QTL se localizam bem próximos no cromossomo 1 enquanto o terceiro QTL se localiza no cromossomo 9. Recentemente, seis QTL nos cromossomos 1, 2, 6, 7 e 10 foram identificados em uma população de RIL obtida pelo cruzamento de Ki3 (resistente) com CML139 (susceptível) (GEORGE et al., 2003) com base em testes na Índia, Indonésia, Tailândia e Filipinas. Nair et al. (2004) identificaram locos de resistência ao míldio nos cromossomos 2, 3 e 6 na linhagem indiana NAI116. Sabry et al. (2006) detectaram três QTL para a resistência ao míldio em diferentes ambientes utilizando mapeamento por intervalo composto. O QTL no cromossomo 2 é de efeito maior e explica 70% da variação fenotípica na Tailândia, onde a pressão da doença foi mais elevada. Os outros dois QTL nos cromossomos 3 e 9 apresentam efeitos menores, cada um explicado não mais de 4% da variação fenotípica.

Marcadores moleculares fortemente ligados aos locos de resistência podem diminuir a necessidade das avaliações fenotípicas para identificar e selecionar plantas resistentes, o que contribuiria para aumentar a eficiência de um programa de melhoramento genético. Em milho, marcadores moleculares vêm sendo empregados com sucesso na identificação de regiões genômicas relacionadas a características controladas por poucos genes, facilitando a seleção indireta de genótipos de interesse. A identificação de marcadores moleculares associados com a resistência ao míldio fornecerá subsídio para um programa de melhoramento assistido, reduzindo o tempo e os custos envolvidos na geração de novos cultivares. Este trabalho teve como objetivos identificar e mapear QTL de resistência ao míldio em milho para posterior emprego em um programa de seleção assistida por marcadores.



## Material e Métodos

### *Material Genético*

Uma população com 120 progênies  $F_{2:3}$  segregando para a resistência ao míldio foi obtida pelo cruzamento entre as linhagens L18 (resistente) e L19 (suscetível) do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

### *Avaliação Fenotípica*

A avaliação da resistência ao míldio foi realizada por meio de inoculação natural na Estação Experimental da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas-MG em novembro de 2009. Quinze plantas de cada família  $F_{2:3}$  L18 x L19, além dos parentais e do híbrido  $F_1$ , foram avaliadas em blocos casualizados, com duas repetições. A suscetibilidade ou a resistência foram avaliadas pelo aparecimento dos sintomas do míldio após o florescimento. O escore da resistência foi obtido pela fórmula:  $R\ score = (\text{número de plantas resistentes} / \text{número total de plantas por fileira}) \times 100$ . A média do  $R\ score$  das famílias  $F_{2:3}$  nas duas réplicas foi empregada para o posterior mapeamento de QTL.

### *Extração de DNA*

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens de dez plantas de cada uma das 122 progênies  $F_{2:3}$ , dos parentais L18 e L19 e do híbrido  $F_1$ , de acordo com método descrito por Saghai-Marooof et al. (1984). O DNA genômico foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) com um padrão de concentração conhecido para sua quantificação e avaliação de integridade, de acordo com Sambrook et al. (1989).

### *Marcadores microssatélites*

Um total de 500 marcadores microssatélites foram avaliados entre as linhagens parentais e o híbrido  $F_1$  para a identificação de polimorfismos, sendo posteriormente aplicados na população de mapeamento. As sequências dos iniciadores estão disponíveis na *Maize Genetics and Genomics Database* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Jardim (2007) e os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 4% em tampão TAE 1X de acordo com Sambrook et al. (1989).

### *Mapa de Ligação*

A segregação de cada loco microssatélite foi avaliada quanto aos desvios da segregação esperada para a população de  $F_{2:3}$  (1:2:1) por meio do teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). As análises de ligação foram realizadas com  $LOD > 3,0$  e frequência de recombinação menor que 0,4; utilizando o programa MapMaker/EXP versão 3.0 (LANDER et al., 1987). As distâncias em centiMorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

### *Mapeamento de QTL*

O mapeamento de QTL para a resistência ao míldio foi realizado pela metodologia de intervalo composto ou CIM (JANSEN; STAM, 1994; ZENG, 1994) implementada pelo programa QTL Cartographer versão 2.5 para Windows (WANG et al., 2006). Para controlar a interferência de múltiplos QTL foi utilizado o modelo 6 e a regressão *forward* utilizando 20 cofatores e uma janela de 10 cM. A localização mais provável dos QTL dentro do intervalo

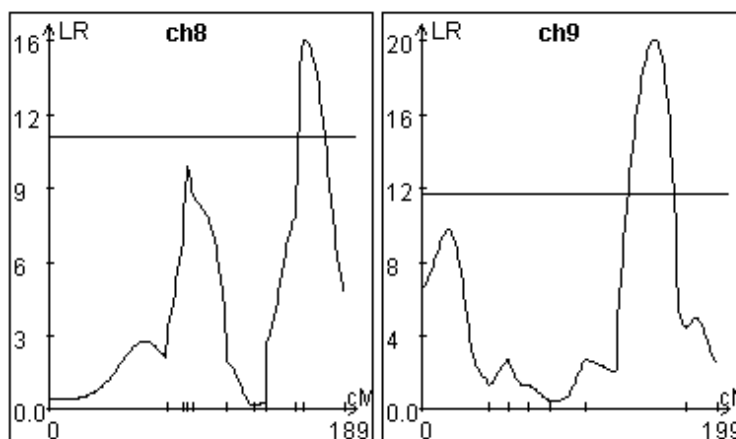


bem como as estimativas de seus efeitos genéticos foram determinadas pelo método da Máxima Verossimilhança (FISHER, 1921) com testes realizados a cada 1 cM. O QTL foi declarado presente na posição em que o valor de LOD foi superior ao limite de significância determinado por 1000 permutações segundo Churchill e Doerge (1994).

### Resultados e Discussão

Um total de 104 marcadores microssatélites polimórficos entre L18 e L19 foram usados para a construção do mapa de ligação, gerando dez grupos de ligação com 2054,7 cM e com distância média entre os marcadores de 21,63 cM.

Pelo método de mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1994; JANSEN; STAM, 1994) foram mapeados dois QTL para resistência ao míldio na população  $F_{2:3}$  L18 x L19 no cromossomo 8 (QTL<sub>8,1</sub>) e no cromossomo 9 (QTL<sub>9,1</sub>) com base no índice fenotípico *R score* (Figura 1).



**Figura 1.** Mapeamento de QTL para a resistência ao míldio em milho. QTL detectados nos cromossomos 8 e 9. Limite de significância obtido por 1000 permutações segundo Churchill e Doerge (1994).

**Tabela 1.** QTL associados à resistência ao míldio em milho por meio de mapeamento por intervalo composto na população  $F_{2:3}$  L18 x L19



para o índice R Score. Localização genômica, porcentagem de variância fenotípica.

<b>Cromossomo</b>	<b>Marcador</b>	<b>LR</b>	<b>Variância Fenotípica (%)</b>
8	10	15.59	14
9	6	19.82	10

A maioria das características de interesse econômico da cultura do milho são quantitativas e por causa de efeitos ambientais surgem dificuldades para determinar corretamente o genótipo dos indivíduos. A fim de contornar este problema, sofisticados métodos quantitativos têm sido desenvolvidos, incluindo o mapeamento de QTL, para que por meio de associações estatísticas entre marcadores e fenótipos seja possível proporcionar uma melhor compreensão sobre a arquitetura genética desses caracteres. Neste estudo, foram mapeados dois QTL para a resistência ao míldio em milho. O QTL detectado no cromossomo 8 ainda não havia sido descrito em literatura, sendo assim inédito. O QTL detectado no cromossomo 9 havia sido descrito por Agrama et al. (1999) e por Sabry et al. (2006) em outras populações.

Pode-se afirmar que os QTL mapeados neste trabalho têm consistência com a literatura, embora existam algumas diferenças que podem ser devido a populações e marcadores empregados e aos métodos estatísticos, o que dificulta comparações entre análises de QTL desenvolvidas entre grupos diferentes. Todos os QTL mapeados juntos explicaram mais de 24% da variação fenotípica, sugerindo que eles podem ser considerados para futuros estudos. A variância não explicada pelos QTL neste estudo pode ser devida a QTL de pequeno efeito não detectados e a interações epistáticas entre QTL.

Com a disponibilidade crescente de informações sobre o genoma do milho, em um futuro próximo, será possível identificar quais os genes destas regiões estão associados com QTL e uma melhor compreensão da base genética dessa característica.

### **Agradecimentos**

Este trabalho teve apoio financeiro da Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Agradecemos especialmente ao Célio Ramos das Neves e Clóvis Geraldo Ribeiro pelo apoio na condução dos experimentos.

### **Referências**

AGRAMA, H. A.; MOUSSA, M. E.; NASER, M. E.; TAREK, M. A.; IBRAHIM, A. H. Mapping of QTL for downy mildew resistance in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 519-523, 1999.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; BLUM, M. M. Quantificação de danos causados por doenças em milho. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., 2004, Viçosa, MG. **Quantificação de perdas no manejo de doenças de plantas: anais**. Viçosa,



MG: Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitopatologia, 2005. v. 1, p. 43-59.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Austin, v. 138, p. 963-971, 1994.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos: safra 2009/2010: quinto levantamento: fevereiro 2010. Brasília, 2010. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/05\\_levantamento\\_fev2010.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/05_levantamento_fev2010.pdf)> Acesso em: 05 mar. 2010.

COSTA, R. V. da; COTA, L. V. **Controle químico de doenças na cultura do milho**: aspectos a serem considerados na tomada de decisão sobre aplicação. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 11 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 125).

FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. **Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 13).

FISHER, R. A. A. On the mathematical foundations of statistics. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 222 p. 309-368, 1921.

GEORGE, M. L.; PRASANNA, B. M.; RATHORE, R. S.; SETTY, T. A.; KASIM, F.; AZRAI, M.; VASAL, S.; BALLA, O.; HAUTEA, D.; CANAMA, A.; REGALADO, E.; VARGAS, M.; KHAIRALLAH, M.; JEFFERS, D.; HOISINGTON, D. Identification of QTLs conferring resistance to downy mildews of maize in Asia. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 107, p. 544-551, 2003.

JANSEN, R. C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 1447-1455, 1994.

JARDIM, S. N. **Mapeamento comparativo de regiões genômicas de milho (*Zea mays* L.) associadas com a tolerância ao alumínio**. 2007. 70 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, London, v. 12, p. 172-175, 1944.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v. 1, p. 174-181, 1987.

NAIR, S. K.; PRASANNA, B. M.; RATHORE, R. S.; SETTY, T. A. S.; KUMAR, R.; SINGH, N. N. Genetic analysis of resistance to sorghum downy mildew and Rajasthan downy mildew in maize (*Zea mays* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 89, p. 379-387, 2004.



REZENDE, V. F.; VENCOVSKY, R.; NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; SILVA, H. P.; BEARZOTI, E.; CAMARGO, L. E. A. Mixed inheritance model for resistance to anthracnose leaf blight in maize **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, p. 115-122, 2004.

SABRY, A.; JEFFERS, D.; VASAL, S. K.; FREDERIKSEN, R.; MAGILL, C. A region of maize chromosome 2 affects response to downy mildew pathogens. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, p. 321-330, 2006.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v. 3.

WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z.-B. **Windows QTL Cartographer V2.5**. Raleigh: North Carolina State University, Department of Statistics, 2006. Disponível em: <<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>>. Acesso em: 14 abr. 2010.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 1457-1468, 1994.

